

Rec'd PCT/PTO 17 JUN 2005

10/539534

PCT/JPC3/16549

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

24.12.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 2 年 1 2 月 2 4 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 2 - 3 7 1 6 2 1
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 3 7 1 6 2 1]

出 願 人
Applicant(s): エーザイ株式会社

REC'D 19 FEB 2004

WIPO

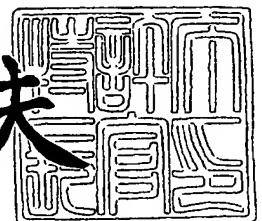
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 2 月 5 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 E1-A0204

【提出日】 平成14年12月24日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

 【住所又は居所】 滋賀県大津市若葉台 1 1 - 5 0 チュリス石山 2 0 9

 【氏名】 梅田 一彰

【特許出願人】

 【識別番号】 000000217

 【氏名又は名称】 エーザイ株式会社

 【代表者】 内藤 晴夫

【代理人】

 【識別番号】 100102978

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

 【識別番号】 100108774

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 041092

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 高効率遺伝子ターゲティングベクター

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 非ヒト動物の Z O - 1 遺伝子領域へ外来遺伝子を導入するための遺伝子ターゲティングベクターであって、該外来遺伝子、および該 Z O - 1 遺伝子の全領域もしくは部分領域を有することを特徴とするベクター。

【請求項 2】 外来遺伝子発現非ヒト動物または外来遺伝子発現非ヒト動物細胞の作製用ベクターである、請求項 1 に記載のベクター。

【請求項 3】 外来遺伝子の上流に該遺伝子を転写し得るプロモーターを備えた、請求項 1 または 2 に記載のベクター。

【請求項 4】 さらにマーカー遺伝子発現カセットを含む、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のベクター。

【請求項 5】 マーカー遺伝子発現カセットの下流に外来遺伝子が隣接して配置された構造を有する、請求項 4 に記載のベクター。

【請求項 6】 外来遺伝子がマーカー遺伝子発現カセットである、請求項 1 または 2 に記載のベクター。

【請求項 7】 マーカー遺伝子発現カセットが薬剤耐性遺伝子発現カセットである、請求項 4 ～ 6 のいずれかに記載のベクター。

【請求項 8】 薬剤耐性遺伝子発現カセットが β -g e o である、請求項 7 に記載のベクター。

【請求項 9】 外来遺伝子の上流および／または下流に、Z O - 1 遺伝子の全領域もしくは部分領域が配置された構造を有する、請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載のベクター。

【請求項 1 0】 Z O - 1 遺伝子の部分領域が、該遺伝子の第二エクソンまたは第二エクソンの一部を含む領域である、請求項 9 に記載のベクター。

【請求項 1 1】 Z O - 1 遺伝子の第二エクソンの一部およびその上流を含む 5.1 kb の PstI-BsrDI 断片、および該第二エクソン下流の 3.9 kb の PstI-SphI 断片が、外来遺伝子の両脇にそれぞれ配置された構造を有する、請求項 1 0 に記載のベクター。

【請求項 12】 非ヒト動物がマウスである、請求項 1～11 のいずれかに記載のベクター。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、高効率で遺伝子ターゲティング可能なベクターに関する。

【0002】

【従来の技術】

遺伝子ターゲティング (gene-targeting; 非特許文献 1 参照) とは外来性の DNA 断片を哺乳類の細胞に導入し、内在性の DNA シーケンスとの間に相同組み換えを起こさせる遺伝子破壊法もしくは遺伝子導入法である。この方法は特にマウスの胚性幹細胞 (embryonic stem cell; ES 細胞) において、多くの遺伝子に様々な変異を作り出すこと、または外来性遺伝子を発現させることに広く用いられている。この ES 細胞をマウスに戻すことにより、目的遺伝子が欠失したマウス、または外来性遺伝子を発現させたマウスを作製することができる。これらのマウスの表現型を個体内で解析することにより、目的遺伝子の生体内における機能を類推することができる。しかし、一般的にこの相同遺伝子組み換えの頻度は、外来遺伝子が導入された細胞の 1～0.1% という非常に低い頻度でしか起こらない。この効率が上がれば、遺伝子を自由に改変することが容易に可能になり、様々な医療、研究分野での応用が期待できる。しかしながら、これまでのところ、高効率で遺伝子ターゲティング可能なベクターは知られていなかった。

【0003】

【非特許文献 1】

A.L. Joyner 著、「Gene Targeting Second Edition」、オックスフォード大学出版 (OXFORD University Press)

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、高効率な遺伝子ターゲティングベクターを提供することである。

【0 0 0 5】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った。本発明者は、上皮細胞においてタイトジャンクション(tight junction)の裏打ちタンパク質として局在するZO-1遺伝子のノックアウトマウスを作製する過程で、相同組み換えが90%以上の高い確率で起こるターゲティングベクター(targeting vector)を開発した。

【0 0 0 6】

本発明のベクターを利用することにより、ES細胞に対して外来遺伝子をZO-1のアリル(allele)に容易に導入することが可能となる。本発明のターゲティングベクターによって得られたシングルノックアウトES細胞、および、このシングルノックアウトES細胞をマウスに戻して作製された、ヘテロマウスにおいては何ら表現型が見いだされないことから、ZO-1の一方のアリルに外来遺伝子を導入することは細胞の機能には影響がないと考えられる。このことは外来遺伝子を発現させる場合、ゲノム構造の影響を考慮しなくても良い利点がある。すなわち、従来のトランスジェニックマウス作成法や細胞の安定なトランスフォーマント(stable transformant)作成時の欠点が解決出来ることが予測される。

【0 0 0 7】

また、現在、いくつかの細胞株しか相同組み換えによるジーンターゲティングは成功していないが、薬剤スクリーニングや病態の解析に適した細胞株に対し、このベクターを用いてジーンターゲティングの条件検討を行うことにより、遺伝子破壊された細胞株を作製できる応用性も期待される。

【0 0 0 8】

上記の如く本発明者は、外来遺伝子導入動物を作製する際に、該動物におけるZO-1遺伝子を、外来遺伝子を導入するターゲット部位とすることにより、高効率に遺伝子ターゲティングが可能であることを見出した。即ち、ZO-1遺伝子をターゲット部位とするベクターは、高効率に外来遺伝子を導入できることを初めて見出し、本発明を完成させた。

【0 0 0 9】

本発明は、高効率遺伝子ターゲティングベクターに関し、より具体的には、

〔1〕 非ヒト動物の Z O-1 遺伝子領域へ外来遺伝子を導入するための遺伝子ターゲティングベクターであって、該外来遺伝子、および該 Z O-1 遺伝子の全領域もしくは部分領域を有することを特徴とするベクター、

〔2〕 外来遺伝子発現非ヒト動物または外来遺伝子発現非ヒト動物細胞の作製用ベクターである、〔1〕に記載のベクター、

〔3〕 外来遺伝子の上流に該遺伝子を転写し得るプロモーターを備えた、〔1〕または〔2〕に記載のベクター、

〔4〕 さらにマーカー遺伝子発現カセットを含む、〔1〕～〔3〕のいずれかに記載のベクター、

〔5〕 マーカー遺伝子発現カセットの下流に外来遺伝子が隣接して配置された構造を有する、〔4〕に記載のベクター、

〔6〕 外来遺伝子がマーカー遺伝子発現カセットである、〔1〕または〔2〕に記載のベクター、

〔7〕 マーカー遺伝子発現カセットが薬剤耐性遺伝子発現カセットである、〔4〕～〔6〕のいずれかに記載のベクター、

〔8〕 薬剤耐性遺伝子発現カセットが β -g e o である、〔7〕に記載のベクター、

〔9〕 外来遺伝子の上流および／または下流に、Z O-1 遺伝子の全領域もしくは部分領域が配置された構造を有する、〔1〕～〔8〕のいずれかに記載のベクター、

〔10〕 Z O-1 遺伝子の部分領域が、該遺伝子の第二エクソンまたは第二エクソンの一部を含む領域である、〔9〕に記載のベクター、

〔11〕 Z O-1 遺伝子の第二エクソンの一部およびその上流を含む 5.1 kb の PstI-BsrDI 断片、および該第二エクソン下流の 3.9 kb の PstI-SphI 断片が、外来遺伝子の両脇にそれぞれ配置された構造を有する、〔10〕に記載のベクター、

〔12〕 非ヒト動物がマウスである、〔1〕～〔11〕のいずれかに記載のベクター、を提供するものである。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明は、外来遺伝子を高効率に導入可能な遺伝子ターゲティングベクターに関する。本発明は、非ヒト動物のZ0-1遺伝子領域を、外来遺伝子挿入のための標的部位とすることを特徴とする、ターゲティングベクターである。本発明は、非ヒト動物のZ0-1遺伝子領域へ外来遺伝子を導入するための遺伝子ターゲティングベクター（単に、「ベクター」と記載する場合あり）を提供する。本発明のベクターは、外来遺伝子発現非ヒト動物または外来遺伝子発現非ヒト動物細胞の作製に有用である。

【0011】

Z0-1遺伝子の塩基配列は既に知られており、当業者においては、Z0-1遺伝子の塩基配列についての情報を公共の遺伝子バンクから容易に取得することが可能である。例えば、マウスZ0-1遺伝子の塩基配列についての情報は、GenBankからアクセス番号NM_009386により取得することができる。Z0-1遺伝子の塩基配列の一例として、GenBankからアクセス番号NM_009386により取得されるマウスZ0-1遺伝子の塩基配列を配列番号：1に示す。

【0012】

本発明のベクターは、外来遺伝子、およびZ0-1遺伝子の全領域もしくは部分領域を有することを特徴とするターゲティングベクターである。本発明のベクターを利用することにより、外来遺伝子が染色体へ挿入された外来遺伝子導入動物を作製することが可能である。

【0013】

「遺伝子ターゲティング」とは、同じ塩基配列を有するDNA分子間で起こる相同組み換えという現象を利用して、人為的に染色体上の遺伝子を改変することを言う。この「改変」には、遺伝子破壊もしくは遺伝子挿入が含まれる。つまり、染色体上の標的配列と相同的な配列を有するベクターを細胞へ導入することにより、相同部分で組み換えが起こり、ベクター（もしくは、その一部）が染色体へ挿入される。

【0014】

本発明の好ましい態様においては、外来遺伝子が挿入される染色体部位（標的

部位)の両脇のDNA領域と相同な塩基配列からなるDNA断片が、該外来遺伝子の両脇に配置された構造を持つベクターである。本発明の上記ベクターを細胞へ導入すると、外来遺伝子の両脇の相同DNA領域と、標的部位の両脇のDNA領域との間で、相同組み換えが起こり、外来遺伝子が染色体上の標的部位へ挿入される。

【0015】

本発明において外来遺伝子の挿入の標的となり得る染色体上のDNA部位は、Z0-1遺伝子上であれば特に制限されず、エクソン、イントロン、またはプロモーター等の遺伝子発現制御領域であってもよい。従って本発明のベクターの好ましい態様としては、外来遺伝子の上流および/または下流に、Z0-1遺伝子の全領域もしくは部分領域が配置された構造を有する。

【0016】

また、外来遺伝子はZ0-1遺伝子上であれば任意の領域へ挿入することが可能であるが、好ましくは、Z0-1遺伝子の第二エクソンまたは第二エクソンの一部を含むDNA領域へ挿入される。従って、本発明のベクターに含まれるZ0-1遺伝子の領域としては、例えば、Z0-1遺伝子の第二エクソン全体もしくは第二エクソンの一部を含むようなZ0-1遺伝子上のDNA領域であることが好ましい。上記の第二エクソンの一部を含むDNA領域の具体例としては、第二エクソンの一部およびその上流を含む5.1 kbのPstI-BsrDI断片、および第二エクソンの下流の3.9 kbのPstI-SphI断片(図1参照)を挙げることができるが、これに限定されない。本発明のベクターとしては、例えば、上記の2つの断片がそれぞれ、外来遺伝子の上流部または下流部に配置された構造を有するベクターを示すことができる。

【0017】

本発明の外来遺伝子は、必ずしも制限されるものではないが、通常、タンパク質を発現し得る(タンパク質をコードする)遺伝子である。本発明のベクターによって発現させるタンパク質としては、天然または人工タンパク質であるかを問わず、所望のタンパク質を挙げることができる。天然のタンパク質としては例えば、分泌タンパク質、膜タンパク質、細胞質タンパク質、核タンパク質、ホルモン、サイトカイン、増殖因子、受容体、酵素、ペプチド等を挙げられる。人工タンパク質としては、例えば、キメラ毒素などの融合タンパク質、ドミナントネガ

ティブタンパク質（受容体の可溶性分子または膜結合型ドミナントネガティブ受容体を含む）、欠失型の細胞接着分子および細胞表面分子等が挙げられる。また、分泌シグナルや膜局在化シグナル、核移行シグナル等を付加したタンパク質であってもよい。また、アンチセンスRNA分子またはRNA切断型リボザイム等を発現させることにより、細胞における発現が望ましくない遺伝子について、その発現を抑制する、または遺伝子産物の機能を抑制することもできる。

【0018】

本発明の外来遺伝子は、該遺伝子が転写し得るようにプロモーターと機能的に結合した構造、所謂「発現カセット」であることが好ましい。上記「機能的に結合した」とは、プロモーターの転写の活性化に伴い、下流の遺伝子の発現が誘導されるようにプロモーターと下流の遺伝子が結合していることを言う。

【0019】

上記プロモーターとしては、遺伝子自体に本来備わっているプロモーターを挙げることができるが、これ以外にも、発現させたい外来遺伝子の種類、および外来遺伝子を導入する細胞の種類等を考慮して、当業者においては公知のプロモーターから適宜選択して使用することができる。具体的には、サイトメガロウイルス(CMV)由来プロモーター、EF-1 α プロモーター、 β アクチンプロモーター、ラウス肉腫ウイルス由来(RSV)プロモーター、SV40プロモーター、TKプロモーター、PGKプロモーター、SR α プロモーター等を例示することができるが、特にこれらに制限されない。

【0020】

本発明のベクターに含まれるZO-1遺伝子領域と相同なDNA（単に、「相同DNA」と記載する場合あり）の長さは、相同組み換えが生じ得る長さであれば特に制限されない。一般的に、相同領域は長いほど相同組み換えの効率が高いことが知られていることから、本発明のベクターに含まれるZO-1遺伝子と相同なDNA領域も長いことが好ましい。通常、マウスES細胞の相同組み換えには、外来遺伝子両脇の「相同DNA」の合計が5kb以上、少なくとも片側の長さは0.5～2kb以上が好ましいとされている。従って、本発明のベクターに含まれる「相同DNA」の長さは、通常、合計5kb以上であり、外来遺伝子両脇に位置する「相同DNA」の長さは、片

側において好ましくは0.5kb以上、より好ましくは2kb以上である。

【0021】

また、染色体へ外来遺伝子が導入された細胞を選択するため、または外来遺伝子が導入されたことを確認ために、本発明のベクターは、マーカー遺伝子発現カセットを含むことが好ましい。「マーカー遺伝子発現カセット」とは、マーカー遺伝子が発現し得るようにプロモーターと機能的に結合した構造を有するDNA断片を指す。

【0022】

上記「マーカー遺伝子」としては、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子(neo)等の薬剤耐性遺伝子を利用することができる。薬剤耐性遺伝子を挿入した場合には、薬剤を含む培地で培養することにより相同組み換えを生じた細胞株を選抜することができる。具体的には、本発明のマーカー遺伝子として、 β -geo（順に、La cZ, neo, polyA）、ハイグロマイシン、ピューロマイシン等を好適に使用することができる。

【0023】

また、本発明のベクターが上記マーカー遺伝子発現カセットを含む場合、本発明のベクターは、該発現カセットの下流(3'側)に外来遺伝子が隣接して配置された構造であることが好ましいが、必ずしもこの構造に制限されるものではない。また、本発明の「外来遺伝子」が上記マーカー遺伝子発現カセットであってもよい。

【0024】

また本発明には、ZO-1遺伝子の全領域もしくは部分領域を有し、外来遺伝子を含まない遺伝子ターゲティング用ベクターも包含される。即ち、前記ベクターが提供されれば、適当なベクター上の部位へ、外来遺伝子、加えてマーカー遺伝子発現カセットをクローニングすることは、当業者においては通常行い得ることである。前記ベクターは、外来遺伝子、および必要に応じてマーカー遺伝子発現カセットを容易に挿入できるようにするために、挿入部位にクローニングサイトを設計することができる。該クローニングサイトは、例えば制限酵素の認識配列とすることができる。これにより、該制限酵素部位に外来遺伝子、および必要に応

じてマーカー遺伝子発現カセットを挿入することができる。クローニングサイトは、複数の制限酵素認識配列を有する、いわゆるマルチクローニングサイトとしてもよい。これらのクローニングサイトの設計および構築は、当業者においては、一般的な遺伝子工学技術を用いて行うことが可能である。

【0025】

さらに本発明のベクターは、細胞へ導入された際にベクターを含む細胞を選択するために、必要に応じて上記のマーカー遺伝子とは異なる種類の複数のマーカー遺伝子を備えることができる。

【0026】

本発明のベクターの基本骨格は、特に制限はなく、例えば、pBluescript、pGEM vector（製造元プロメガ株式会社）、pUC vector（製造元タカラバイオ株式会社）等の市販のベクターを適宜利用することができる。

当業者においては、例えば、市販のベクターを利用して、一般的な遺伝子工学技術により、本発明のベクターを構築することが可能である。

【0027】

本発明のベクターを利用して染色体へ外来遺伝子を導入することが可能な動物は、好ましくは、マウスを挙げることができるが、Z0-1遺伝子または該遺伝子のホモログを有する非ヒト動物であれば、特に制限されない。マウスZ0-1遺伝子のホモログとしてイヌZ0-1遺伝子が知られているが、基本的には、全哺乳類においてZ0-1遺伝子は発現していると考えられるため、本発明のベクターは全哺乳類に有用であると考えられる。マウス以外の動物として、例えば、ペットや家畜、実験動物などで利用されているイヌ、ラット、ハムスター、ウサギ、ブタ、ウシ、ウマ、ニワトリ、サル、ヒツジ、ヤギ、ネコ等を挙げることができる。

【0028】

外来遺伝子が染色体へ挿入され、該遺伝子を発現する細胞は、当業者においては、本発明のベクターを用いることにより、公知の方法によって容易に作製することができる。例えば、本発明のベクターをエレクトロポレーション法等によって細胞へ導入し、該細胞の培養を行う。次いで、相同組み換えによって外来遺伝子が染色体へ挿入された細胞を、適宜マーカー等を利用して選択する。

【0029】

また、本発明のベクターを用いた遺伝子導入非ヒト動物の作製は、例えば、マウスにおいては以下のようにして行うことができるが、この方法に制限されず、当業者においては、マウス以外の非ヒト動物においても一般的な遺伝子工学技術により、本発明のベクターを利用して遺伝子導入非ヒト動物を作製することができる。まず、任意の外来遺伝子を含む本発明のベクターを、エレクトロポレーション法等によりマウスにES細胞株へ導入し、相同組み換えを生じた細胞株を選抜する。得られたES細胞株をマウス胚盤葉にインジェクションしキメラマウスを得ることができる。このキメラマウスを交配させることで、外来遺伝子がマウス染色体のZ0-1遺伝子対の一方へ導入されたマウスを得ることができる。さらに、このマウスを交配させることで、外来遺伝子がマウス染色体のZ0-1遺伝子対の双方へ導入されたマウスを取得することができる。

【0030】

本発明のベクターによって染色体へ挿入された外来遺伝子の発現量は、当業者に公知の方法によりアッセイすることが可能である。遺伝子の転写産物は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR、RNAプロテクションアッセイ等により検出することができる。ノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCR等による検出は in situ でも行うことが可能である。また、翻訳産物を検出するには、抗体を用いたウェスタンブロット、免疫沈降、RIA、ELISA、プルダウンアッセイ等により行うことができる。さらに、遺伝子導入の検出を容易にするため、発現させるタンパク質にタグを付加したり、外来遺伝子に加えてレポーター遺伝子を発現するように本発明のベクターを構築することも可能である。レポーター遺伝子は、 β ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、アルカリホスファターゼ、またはGFP(Green Fluorescent Protein)をコードする遺伝子等が挙げられるがこれらに特に制限されず、当業者においては、細胞の種類等を考慮し、適当なレポーター遺伝子を適宜選択することができる。

【0031】

【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

〔実施例 1〕 ターゲティングベクターの作製

ZO-1がコードされたゲノムを得る為に、 λ ファージ129/Svマウスジェノミックライブラリーに対して、マウスZO-1 cDNA プローブを用いてスクリーニングし、4つの重複するゲノム断片を得た。制限酵素によるマッピングとDNAシーケンスにより、マウスZO-1のgenomic locusを決定した(図1A)。取得したZO-1遺伝子を含むゲノム断片は4個のエクソンからなり、エクソン1に開始コドンが存在していた。

【0032】

ターゲティングベクターは第2エクソンの一部を除く形で設計した。このベクターはカセットとして、 β -geo(順にLacZ, neo, poly A)を含んでいる。第2エクソンの一部およびその上流を含む5.1-kbのPstI-BsrDI断片と、第2エクソン下流の3.9-kbのPstI-SphI断片を、上記カセットの上流部、下流部にそれぞれライゲーションした。このターゲティングベクターにより、相同組み換えがターゲティングベクターとZO-1遺伝子の間に起こると、エクソン2の一部を含む領域が除かれ、 β -geoが挿入される。

【0033】

〔実施例 2〕 ジーンターゲティング

ターゲティングベクターは5' 相同領域断片の5' 側に存在するuniqueサイトのSacIIで直線化(linealize)した。その後、7~8回passageしたES細胞へGene Pulser (Bio-Rad Laboratories) を用いてエレクトロポレーションを行い、遺伝子導入した。これらのES細胞は通常培地中で、feeder細胞の上で36~48時間培養した。次に175mg/mlのG418中を含む培地中で7~13日培養した。G418耐性コロニーを分離し、3' 側相同領域断片の外側に対するゲノム断片(290bp)を用いたサザンプロットによりスクリーニングを行った。正しく相同組み換えが起こったクローンはゲノムをPvuIIで消化すると、野生型では、6.3-kbの断片が、相同組み換えが起こったアリル(allele)では4.7-kbの断片が認められた(図2)。176個のG418耐性コロニーの中で、相同組み換えが一度起こっていたクローンは167個であ

った。すなわち約95%の効率でターゲティングが起こることが確認された。このことはこのターゲティングベクターが通常に比べ、高い相同組み換え効率があることを示している。

【0034】

既に本発明では、他の細胞株F9 teratocarcinoma cellにおいても、高効率に相同組み換えによるZO-1遺伝子のジーンターゲティングが起こることも確認している。

【0035】

【発明の効果】

本発明のベクターを利用することにより、ES細胞に対して外来遺伝子をZO-1のアリルに容易に導入することが可能となる。本発明のターゲティングベクターによって得られたシングルノックアウトES細胞、およびこのシングルノックアウトES細胞をマウスに戻して作製されたヘテロマウスにおいては、何ら表現型が見いだされないことから、ZO-1の一方のアリルに外来遺伝子を導入することは細胞の機能には影響がないと考えられる。このことは外来遺伝子を発現させる場合、ゲノム構造の影響を考慮しなくても良い利点がある。すなわち、従来のトランスジェニックマウス作製法や細胞の安定なトランスフォーマント作製時の欠点が解決出来ることが期待される。

【0036】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Eisai Co., Ltd.

<120> High efficient gene targeting vector

<130> E1-A0204

<140>

<141>

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 7046

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

cgccctgagtt gcccgcgacg gctctgcccg ccgacggcac gtctctcggc ggccgcgcgt 60
tccggggaag ttacgtgcgg gagcaggctt tggaggagac gcccgagggt gtaggggaca 120
gccggaggcc cgggtactgc ggagcggcga gccggcggag ggcggcggag gccgagcagg 180
cggccgggtg tgccccgcgg agaagcccgg gcggggcgga cgcttcccgg acttttgtcc 240
cacttgaate ccctccccgt gggccgggcc tttccggcct ccccgcccc tgccccgctc 300
gtccccggga gatgtttatg cggacgggtg cgtgaggagc gggcgggccg gcggcgcgga 360
gtttcgggtc cgaggagctt cgcgcggcgc ggagagagac aagatgtccg ccagggccgc 420
ggccgctaag agcacagcaa tggaggaaac agctatatgg gaacagcaca cagtgcgct 480
tcacagggtc cctgggtttg gatttggaat tgcaatctct ggtggaagag ataactctca 540
ttttcagagt ggggaaacct ccatagtgat ttctgatgtg ttaaaaggag ggccagctga 600
aggacagcta caggaaaatg accgagttgc aatggttaac ggagtttcaa tggataacgt 660
tgaacatgct ttgtgtgtc agcagctaag gaagagtggg aaaaacgcaa aaattactat 720
ccgaaggaag aagaaagttc agatccctgt aagtcaccca gatcctgagc cgggtgtctga 780
taatgaagac gatagttatg acgaagaagt gcatgaccca agagctggcc gcggtgcttt 840
agcgaacaga aggagcgaga agagctgggc aagggatagg agtgcaagca gggagaggag 900
cctgtcccct cgctcggaca ggcgggtccgt ggcctccagt cagcccgcaa agcccaccaa 960
ggtcacactg gtgaagtctc ggaaaaatga agaatatggt cttcgaccgg ccagccacat 1020

atttgtaaag gaaatttcac aagatagttt ggcagcaaga gatggtgaca ttcaagaagg 1080
ggatgttgtc ttgaagataa atggtactgt gacagaaaat atgtcattga cagatgcaaa 1140
aacactgata gaaaggctta aaggcaagtt aaaaatggta gtgcaaagag atgagcgggc 1200
taccttactg aacgtccctg acctttcgga tagtatccat tctgctaattg cctcggaaag 1260
agatgacatt tcagaaattc agtcactagc gtcagaccat tcaggctcgt cgcatgacag 1320
gccaccccg cgcagccagt cacgatctcc tgaccaacgt tcagagccct ccgatcattc 1380
cacgcagtct ccacagcagc ccagcaatgg cagtctccgg agcagagagg aagagcgaat 1440
gtctaaacct ggggccatct caactcctgt aaaacatgta gacgatcatc caccxaaagc 1500
agtggaaaga gttacagttg agaaaaatga gaagcagacg cccactcttc cagaaccgaa 1560
acctgtgtat gctcaagttg gacaaccaga tgtggattta cccgtcagcc cttctgatgg 1620
tgctctgcct aattcagctc atgaagacgg gatacttagg cccagcatga aactggtaaa 1680
attcagaaaa ggagatagtg tgggtttgcg actagctggg ggaaatgatg tcggaatatt 1740
tgtagctggc gttctagaag atagccctgc agccaaagaa ggcttagagg aaggatgatca 1800
aattctcagg gtgaacaatg tagatttcac aaatatcata aggggaagagg ccgtcctttt 1860
cctccttgac ctccctaaag gtgaagaagt gaccatactg gctcagaaga agaaggacgt 1920
ttatcgccgc attgtagaat cagatgtagg agattcattc tatattagaa cgcattttga 1980
atatgaaaaa gaatctcctt acggacttag ttttaacaaa ggagaggtgt tccgggtcgt 2040
ggatacttta tacaatggaa agctgggctc ttggcttgcc attcgaattg gcaaaaatca 2100
taaggaggta gaacgaggca tcatcccaa taagaacaga gctgaacagt tagccagtgt 2160
acagtacaca cttccaaaga cagcgggtgg tgatcgggca gacttctgga ggtttcgagg 2220
tcttcgcagc tccaagagaa atcttcgaaa aagcagagag gacttgtcag ctcagccagt 2280
tcaaactaag ttcccagctt atgaaagggt tgttcttcga gaagctggat tcctaagacc 2340
tgtaaccatc tttggacca tagctgatgt tgccagagaa aagttggcaa gagaggagcc 2400
agatatctat cagattgcaa aaagtgaact acgagacgct gggactgacc atcgtagctc 2460
tggcatcatt cgccttcata caataagca aatcatagat caggataaac atgctttatt 2520
agatgtaacg ccaaatgcgg ttgatcgtct taattatgcg cagtggatc caattgttgt 2580
gttccttaac cctgactcta agcaaggtgt aaaaacaatg aggatgaggt tgtgtccgga 2640
gtctcggaaa agcgcagga agctatatga acgctctcat aagcttcgta agaacaatca 2700
ccatctcttc acaactacaa ttaacttaa ctcaatgaat gatggttggg acggtgcct 2760

gaaagaagcg attcagcagc aacagaacca gctgggtgtgg gtctctgagg ggaaggcgga 2820
tggtgctaca agtgatgacc ttgatttgca tgacgatcgt ctgtcctacc tgtcagcccc 2880
aggtagttag tactcaatgt atagcacgga cagtagacac acttctgact atgaagacac 2940
agatacagaa ggcggggcct acactgatca agaactagat gaaactctta atgatgaggt 3000
ggggactccc ccggagtctg ccattacacg gtcctctgag cctgtaagag aggattcctc 3060
tggaatgcat catgaaaacc agacataccc tccttactca ccacaagcgc agccacaagc 3120
tattcataga atagactccc ctggacttaa gccagcctct caacagaaag cagaagcctc 3180
atctccagtc ccttaccttt cgcctgaaac aaccccagca tcatcagcct ctgcagttaa 3240
tcataatgtc agtgtaacta atgtcagcct ggaggagcct gccccagccc ctcccacctc 3300
gcacgcatca cagcctgggt gtttaggagc accaagtgtc gaggcagctc acgtaggctc 3360
cagaggtgaa ggaccaccat tgccgccgca tgcagaccca gcaaaggtgt acaggaagga 3420
gccatattct gaagaaatga tgagacaaaa ccatatttta aaacaaccag ctcttgggtca 3480
cccagggcag aggccagata aagagccaaa tctagcctat gaaccccaac ttccatatat 3540
agaaaaacaa gccagcagag accttgagca gccgtcatac aggtatgagg tctcaagcta 3600
cacagaccag ttttctcgga actatgacca tcgcctacgg tttgaagatc gaatccctac 3660
ctatgaagac cagtgggtcat attatgatga caaacagccc taccaacctc ggccttttga 3720
gaatcagcat ccccgagacc tggactccag acaacatccc gaagaggctt cagaacgagg 3780
ttattttccag cgttttgaag agccagcccc tctgtcgtac gacagtagaa cacgctatga 3840
gcagctgcct cgaacctcta ctctacgaca tgaagagcag ccagcccctg catatgaggt 3900
gcacaacagg tacaggccag aggcacagcc ctattcttca acaggcccta agtcacttga 3960
gccaagcag tactttgacc agtaccgcg aagttatgag caagttccac caccaggctt 4020
tacctccaaa acaggccatt acgagcctct ccatgggtgt gcagttgtcc ctctctgat 4080
accttctct caacaaaagc cagaagtcct gcgctcggct accaaaccac agcctccacc 4140
cccaacccta actgaggagg aggaggatcc agcaatgaaa ccacagtctg tgctcaccag 4200
agtcaaaatg ttgaaaaca aaagatctgc gtctttggag aacaagaaag atgtgaatga 4260
cactgccagc ttcaagcctc cggaagtagc atctaaacct ccaggtgctt ctcttgctgg 4320
ccctaaacct gtccctcaga gtcagtttag tgagcacgac aaaacgctct acaggctccc 4380
agagcctcag aaacctcaag tgaagccacc cgaagatatt gttcgatcaa atcattacga 4440
ccctgaagag gatgaagaat attaccggaa acagctctcc tactttgacc gaagaagttt 4500

tgagagcaag ccttctgcac atcttctgc tggccatcac tcagagcctg ctaagccagt 4560
ccattctcag agccagccca acttcctag ttactcttca aagggaac ccgaaactga 4620
tgctgtggat agatcattca gtgagaaacg ttatgatcca gccagggcca cgcctcctcc 4680
tcctccgttg ccctcacagt acagccagcc agctccacct ctgtccagct cttctctcca 4740
catacattcc aaggcgccc aggggtgaagg caactcagta tcattggatt ttcagaactc 4800
atatatgtcc aaaccagacc caccctcatc tcagagtaaa ccagcaactt tcagaccacc 4860
aactcgagaa gacccccctc agactttcta tccgcagaaa agtttcccag acaaagctcc 4920
agttaacgga gctgagcaga ctcagaaaac catcactccg gtgtacaatc gattcacacc 4980
aaagccgtac acaagttctg cccggccatt tgaacgcaaa ttgaaagtc cgaagttcaa 5040
ccataatctt ctgccaagtg aaactgtaca taaacctgaa ttgtcttcaa aaactccac 5100
ttccccaaaa actcttatga aagctcatag ttcaacacag cctccagagt ttggcagtgg 5160
agttgaaact ttctctgttc acacagataa gcctaaatat caaatgaata atatcagcac 5220
catgcctaaa gctgtccctg tgagtccttc agctgtggaa gaagatgaag atgaggatgg 5280
tcatactgta gtggctacag ctcgtggcat ttttaacagc aatgggtgtg tgttgagttc 5340
catagaaacc ggtgttagta taattatccc acaaggagcc attcctgaag gaattgagca 5400
agaaatctat ttcaaagtct gcagagacaa tagcattctc ccacctttag ataaagagaa 5460
aggtgaaact ctgctgagcc ccctagtgat gtgtgggccc catggcctca agttcctgaa 5520
gcccgtggag ctacgcttgc cacactgtga ccctaaaacc tggcaaaaca agtgtcttcc 5580
tggagatccg aattaccttg ttggagccaa ctgtgtttct gtcctgattg accactttta 5640
attcttagtg tataggaact ggactaagca atgtgaacgt ggattgaact tactaaatct 5700
aatggaacc actctaata gtattatatt ttcttagaat ttatactgca attggtagta 5760
ttaagcattt gttggaactg atgaaggtta gcgagcatgc ccctgagcca cggtcagaaa 5820
gcatgctaca agctatgtgt tattgagtga agaactgtca ggcatggct agaggttcaa 5880
agatatTTTT gctttgtaat gatttttgta cttttttatg gtcactgctt aacttcacat 5940
actgatttcc gttaaaaata ccagccagta aatgggggtg catttgagtt ctgttctttc 6000
caaagtacac tcaaagtta ttatggcctt ggcctagcat acacatttta tttattata 6060
catgaggtaa tgtgcacaca ttttttaca atgcacctgg aatatataac cagtatagtg 6120
gatttaacag aatgtacag cagggggatt tataacttgg ggaggagg tcaaatgaag 6180
acaattactt attgtatatg aaaacacatt tcttttaggg aaggacacca aagcatgtga 6240

gccccggttca tggcctctga atctataaat taacatatca ccacagacat gtaaccagca 6300
ggaatgcctt accctagtgg gtttaattct tccatcattht cgctgtgtat tactaagttt 6360
ttatgagttc tgtgcatatc tagatactgt accatggaaa agactgagta gattgtggac 6420
ttgatggttt cagaaatgtg caaattacct ggaagaaaat aatgggtgtga cttaaaatat 6480
ttttttgaca ggggggagtgg cagtcttctg ttctttgggc tgtgcatctg agatgtttga 6540
tgctttcagg acgcatgtac ataatgcgtg cataccactt ttgttcttgg tttgtaaatt 6600
aacttttata aactttacct ttttatacat aaacagaacc aagtttctaa ggctaccttt 6660
gtatttcttc ctgtacctct tgagccttga actttgacct ctgcagcaat aaagcagcat 6720
ttctacacat acaaggatcat ttttctaaga aaaagaatgc acagagttgt tacattttta 6780
agtgtgcat ttaaaagata cagttactct agtttgatta aattcttgca aagtatccct 6840
tctgtaaaat ttgtgataca atactgtgcc ctaaagtgtg tttttttact aatagacagt 6900
ttattatggc acatcagcac gatttctgtt tagataatac accactacat tctgttaata 6960
atcagtaggt gtgaaaggat ttcttttgtg gttattaaaa aaaaatctca aatttctaaa 7020
tctgcaagaa taaaactttt taaaat 7046

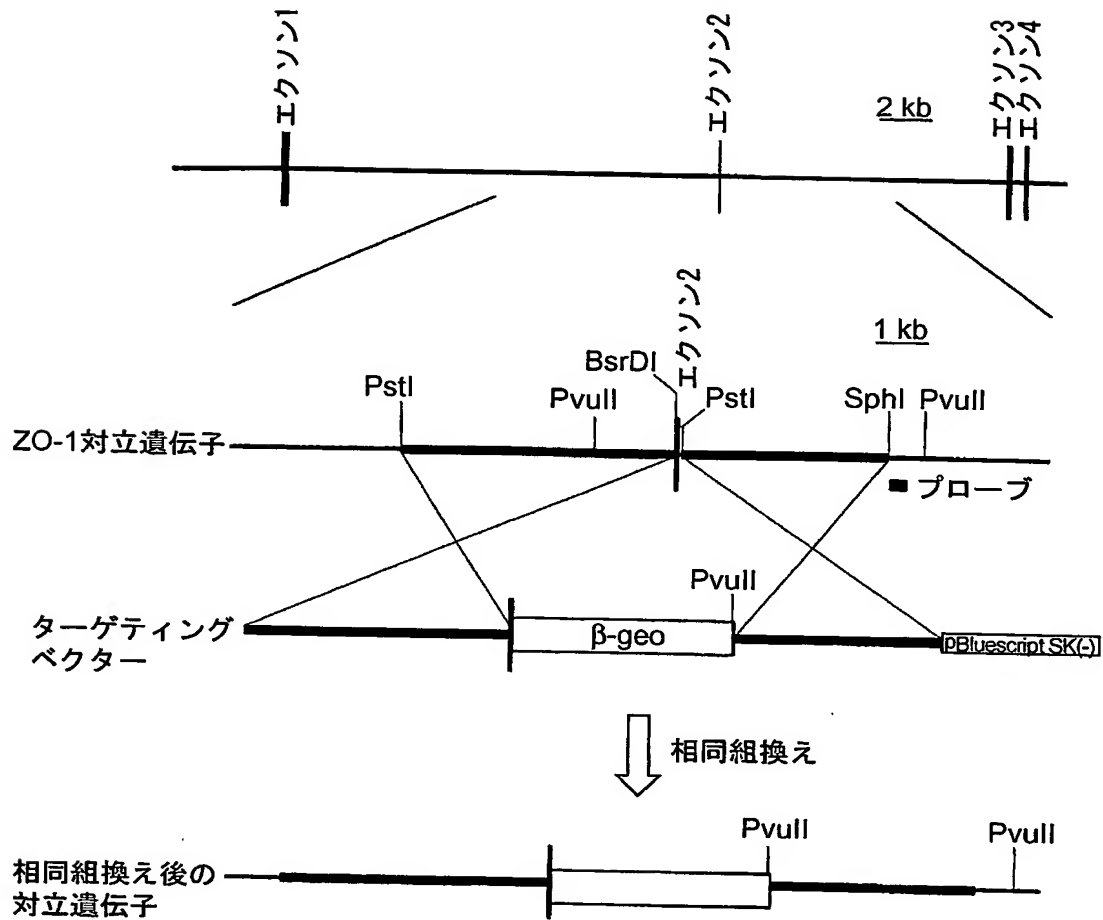
【図面の簡単な説明】

【図 1】 マウス Z0-1 遺伝子座および遺伝子ターゲティングベクターを模式的に示す図である。開始コドンは第 1 エクソンに存在する。β-geo (LacZ/neo/poly A) を中央に含むターゲティングベクターは第 2 エクソンの一部を除く形で作られている。サザンブロッティングに用いた 3' 側プローブを黒線で示した。

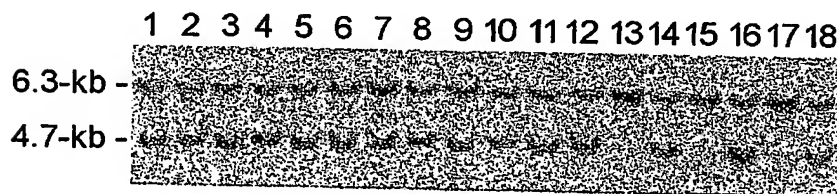
【図 2】 Z0-1 シングルノックアウト細胞の作製結果を示す写真である。PvuI 消化した Z0-1 遺伝子座を 3' 側プローブでサザンブロッティングした結果、野生型遺伝子座から得られる 6.3-kb のバンドと遺伝子破壊後の遺伝子座から得られる 4.7-kb のバンドが得られた (レーン 13, 15, 17 を除くすべてのレーン)。レーン 13, 15, 17 はターゲティングされなかったクローンである。176 個の G418 耐性コロニーの中で、相同組み換えが一度起こっていたクローンは 167 個であった。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 高効率な遺伝子ターゲティングベクターを提供することを課題とする。

【解決手段】 Z0-1遺伝子のノックアウトマウスを作製する過程で、相同組み換えが90%以上の高い確率で起こる遺伝子ターゲティングベクターを開発した。本発明のベクターを利用することにより、ES細胞に対して外来遺伝子をZ0-1のアリルに容易に導入することが可能となる。また、ゲノム構造の影響を考慮しなくも良いため、従来のトランスジェニックマウス作製法や細胞の安定なトランスフォーマント作製時の欠点が解決できることが期待される。

【選択図】 なし

特願 2002-371621

ページ: 1/E

出願人履歴情報

識別番号

[000000217]

1. 変更年月日

1990年 8月29日

[変更理由]

新規登録

住所

東京都文京区小石川4丁目6番10号

氏名

エーザイ株式会社